

This Page Is Inserted by IFW Operations  
and is not a part of the Official Record

## **BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning documents *will not* correct images,  
please do not report the images to the  
Image Problems Mailbox.**

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公表特許公報 (A)

(11) 特許出願公表番号

特表平7-503843

第1部門第1区分

(43) 公表日 平成7年(1995)4月27日

(51) Int.Cl.*	識別記号	庁内整理番号	F I
C 1 2 N 15/09	Z N A		
A 6 1 K 39/255	A F E	9284-4 C	
39/275		9284-4 C	
		9050-4 B	
		C 1 2 N 15/ 00	Z N A A
		(C 1 2 N 15/ 00	Z N A A
	審査請求	未請求	予備審査請求 有 (全 19 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願平5-512546  
 (86) (22) 出願日 平成5年(1993)1月7日  
 (85) 翻訳文提出日 平成6年(1994)7月13日  
 (86) 国際出願番号 P C T / U S 9 3 / 0 0 0 8 4  
 (87) 国際公開番号 W O 9 3 / 1 4 2 1 9  
 (87) 国際公開日 平成5年(1993)7月22日  
 (31) 優先権主張番号 8 2 0 , 0 7 7  
 (32) 優先日 1992年1月13日  
 (33) 優先権主張国 米国 (U S)  
 (31) 優先権主張番号 0 0 1 , 3 9 1  
 (32) 優先日 1993年1月6日  
 (33) 優先権主張国 米国 (U S)

(71) 出願人 ヴァイロジェネティクス コーポレイション  
 アメリカ合衆国 ニューヨーク州 12180  
 トロイ レンスラー テクノロジーパーク  
 ク ジョーダン ロード 465  
 (72) 発明者 バオレッティ, エンゾ  
 アメリカ合衆国 ニューヨーク州 12054  
 デルマー マーレイ アヴェニュー297  
 (72) 発明者 テイラー, ジル  
 アメリカ合衆国 ニューヨーク州 12203  
 -2011 オールバニー コロニアル アヴ  
 ェニュー 33  
 (74) 代理人 弁理士 柳田 征史 (外1名)  
 最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 マレック病ウイルス組換えボックスウイルスワクチン

(57) 【要約】

マレック病ウイルスからの異種DNAを含有する、ワクシニアウイルスまたは鶏痘ウイルスのような、組換えボックスウイルスを提供する。ワクチン接種した宿主動物において免疫応答を誘発する組換えボックスウイルスを含有するワクチンも提供する。

## 請求の範囲

1. ボックスウイルスゲノムの可欠領域にマレック病ウイルスからのDNAを含有することを特徴とする組換えボックスウイルス。
2. 前記DNAがマレック病ウイルスの構造タンパク質をコード化することを特徴とする請求の範囲第1項記載の組換えボックスウイルス。
3. 前記DNAがマレック病ウイルスの糖タンパク質をコード化することを特徴とする請求の範囲第2項記載の組換えボックスウイルス。
4. 前記DNAがマレック病ウイルスの糖タンパク質gBまたは糖タンパク質gDをコード化することを特徴とする請求の範囲第3項記載の組換えボックスウイルス。
5. 前記ボックスウイルスがワクシニアウイルスであることを特徴とする請求の範囲第1項記載の組換えボックスウイルス。
6. 前記ボックスウイルスがアビボックスウイルスであることを特徴とする請求の範囲第1項記載の組換えボックスウイルス。
7. 前記アビボックスウイルスが鶏痘ウイルスであることを特徴とする請求の範囲第6項記載の組換えボックスウイルス。
8. ワクチンを接種した宿主動物に免疫応答を誘発する

ワクチンであって、拒体と、可欠領域にマレック病ウイルスからのDNAを含有する組換えボックスウイルスとからなることを特徴とするワクチン。

9. 前記DNAがマレック病ウイルスの構造タンパク質をコード化して発現させることを特徴とする請求の範囲第8項記載のワクチン。
10. 前記DNAがマレック病ウイルスの糖タンパク質をコード化して発現させることを特徴とする請求の範囲第9項記載のワクチン。
11. 前記DNAがマレック病ウイルスの糖タンパク質gBまたは糖タンパク質gDをコード化して発現させることを特徴とする請求の範囲第10項記載のワクチン。
12. 前記ボックスウイルスがワクシニアウイルスであることを特徴とする請求の範囲第8項記載のワクチン。
13. 前記ボックスウイルスがアビボックスウイルスであることを特徴とする請求の範囲第8項記載のワクチン。
14. 前記アビボックスウイルスが鶏痘ウイルスであることを特徴とする請求の範囲第13項記載のワクチン。
15. 前記宿主動物がニワトリであることを特徴とする請求の範囲第8項記載のワクチン。

## 明 細 書

## マレック病ウイルス組換えボックスウイルスワクチン

## 産業上の利用分野

本発明は修飾ボックスウイルスおよびその製造方法並びに使用方法に関するものである。本発明はさらに詳しくは、そのウイルスがマレック病ウイルス(MDV)遺伝子の遺伝子産生物を発現させる組換えボックスウイルス、およびMDV感染に対して防御免疫を与えるワクチンに関するものである。

本出願において、いくつかの出版物を引用している。これらの参考文献の完全な引用は、請求の範囲の直前で明細書の終りに記載してある。これらの参考文献は本発明に関連する従来技術である。

## 発明の背景

ワクシニアウイルスおよび最近では他のボックスウイルスが、異種遺伝子の挿入および発現に使用されている。異種遺伝子を生感染ボックスウイルスに挿入する基本技術の例としては、供与体プラスミド中に異種遺伝要素を側腹に有する(flanking)ボックスDNA配列とレスキュー(rescuing)ボックスウイルス中に存在する相同配列との間の組換えが挙げられる(ビッチーニ等、1987)。

具体的には、組換えボックスウイルスは従来技術で知ら

れており、米国特許第4,603,112号に記載されているワクシニアウイルスの合成組換え体の産生方法と同様な2段階で構成される。この特許をここに引用する。

第1に、ウイルスに挿入すべきDNA遺伝子配列、特に非ボックス源からの脱取り枠を、ボックスウイルスのDNAの切片と相同のDNAが挿入されるE. coliプラスミド構成物中に配する。別々に、挿入すべきDNA遺伝子配列をプロモーターに連結する。プロモーター-遺伝子結合が、可欠座を含有するボックスDNAの領域を側腹に有するDNA配列と相同のDNAにより両端の側腹にあるように、プロモーター-遺伝子結合をプラスミド構成物中に配置する。産生したプラスミド構成物を次いでE. coliバクテリア内での成長により増幅し(クレウェル、1972)、単離した(クレウェル等、1969; マニアチス等、1982)。

第2に、挿入すべきDNA遺伝子配列を含有する単離したプラスミドをボックスウイルスとともに細胞培養体(例えば、ニワトリ胚胎組織芽細胞)中にトランスフェクションする。プラスミド中の相同ボックスDNAとそれぞれのウイルスゲノムとの間の組換えによって、ゲノムの可欠領域において、異種DNA配列の存在により修飾されたボックスウイルスが得られる。「異種」DNAという用語は、外因性DNA、特に非ボックス源からなるDNAを意味し、これは外因性DNAを配置するゲノムにより通常は産生されない遺伝子産生物をコード化する。

遺伝子組換えは一般的に、DNAの2つの断片の間のDNAの相同切片の交換である。ある種のウイルスにおいては、RNAがDNAの役割を果たしている。核酸の相同切片は、ヌクレオチド塩基の同一配列を有する核酸（DNAまたはRNA）の切片である。

遺伝子組換えは、感染宿主細胞内の新しいウイルスゲノムの複製または製造中に自然に行なわれている。したがって、ウイルス遺伝子間の遺伝子組換えは、2つ以上の異なるウイルスまたは遺伝子構成物に共感染した（co-infected）宿主細胞中に行なわれるウイルス複製サイクル中に行なわれている。第1のゲノムからのDNAの切片は、DNAが第1のウイルスゲノムのDNAと相同である第2の共感染ウイルスのゲノムの切片を構成する際に相互に交換可能に用いられる。

しかしながら、組換えはまた、完全には相同ではない異なるゲノム中のDNAの切片間にも行なわれ得る。そのような切片の1つが、例えば、相同DNAの部分に挿入される抗原決定基のための遺伝子コード化または遺伝子マーカーの第1の切片内に存在することを除いて、別のゲノムの切片と相同の第1のゲノムからのものである場合、組換えがまだ行なわれ得、その組換えの産生物は、その組換えウイルスゲノム中の遺伝子または前記遺伝子マーカーの存在により検出可能である。

修飾感染ウイルスによる挿入（inserted）DNA遺伝子

配列の発現を成功させるのには2つの条件を満たす必要がある。第1に、修飾ウイルスが生存可能であるように、挿入はウイルスの可欠領域中に行なわれなければならない。挿入DNAを発現するための第2の条件は、挿入DNAに対して適切な関係にあるプロモーターが存在することである。プロモーターは、発現すべきDNA配列より上流に位置するように配置しなければならない。

弱毒ベクターは、ワクシニアウイルスのコペンハーゲン菌株からの6つの可欠領域を順次欠失することにより発生させた。これらの領域は、ウイルス毒性における役割を有しているタンパク質をコード化することが知られている。欠失される領域は、tk遺伝子、出血性遺伝子、A型封入遺伝子、血球凝集素遺伝子およびポリヌクレオチド還元酵素の巨大サブユニット並びに以前に定義したC7LからK1Lまでの配列である（パークス等、1990）。ワクシニアウイルスのコペンハーゲン菌株中のこれらの遺伝子の配列およびゲノム位置は以前に定義している（ゲーベル等、1990a、b）。産生した弱毒ワクシニア菌株をNYVACと称する。

ワクシニアウイルス組換え体を産生する技術は、より宿主範囲が制限されたボックスウイルスの系統群の他のものにまで最近広がってきた。

鶏痘ウイルス（FPV）は好ましくは家きん病原体からの抗原を発現するベクターとして産生されている。毒性鳥

インフルエンザウイルスの血球凝集素タンパク質がFPV組換え体中に発現された（テイラー等、1988a）。組換え体をニワトリおよび七面鳥に接種した後、相同または非同種の毒性インフルエンザウイルス抗原投与のいずれかに対して防御する免疫応答が誘発された（テイラー等、1988a）。さらに、ニューカッスル病ウイルスの毒性菌株の表面糖タンパク質（融合および血球凝集素）がFPVベクター中に発現され、防御免疫応答を誘発することが示されている（テイラー等、1990；エドバウアー等、1990；パースネル等、1990a、b）。

FPVはボックスウイルス科のアビボックス属の原型ウイルスである。このウイルスは、生弱毒ワクチンの使用により1920年代以来じょうずにコントロールされている、家きんにおける経済的に重要な病気の原因である。アビボックスウイルスの複製は鳥類に限定されており（エスポイト、1991）、このウイルスがヒトを含む非鳥類において増殖感染することについての報告はどの文献にもない。このような宿主の限定は、ウイルスの他の種への伝染に対して固有の安全障壁を与え、それによってFPVを家きんのワクチンベクターとして利用することが有用性を有するものとなる。

マレック病は、ヘルペスウイルスMDVの感染により生じたニワトリのリンパ増殖（lymphoproliferative）病である。この病気は、以下の部位1つ以上の単核浸透により

特徴付けられる；末梢神経、生殖腺、虹彩、様々な内臓、筋肉および皮膚（カルネックおよびウィッター、1991）。関連のある3つの血清型がある；（1）腫瘍遺伝子MDVを含有する血清型1、（2）非腫瘍遺伝子MDVを含有する血清型2、および（3）密接に関連した七面鳥のヘルペスウイルス（HVT）を含有する血清型3。

シャットがMDVの生物学を考察した（1987）。MDVの感染の様式は鳥間の直接的な接触または間接的な接触によるものであり、空気伝染経路によりウイルスを広げさせる。最初の接触後、ウイルス感染の3つの段階が明らかである。第1段階は初期の細胞溶解性の感染として定義される。この段階中は、結果として細胞を含まないウイルスを放出する増殖感染が羽胞上皮（FPE）中に生じる。同時に、非増殖複製がリンパ器官中に生じる。この段階において、増殖制限感染として定義されるDNA複製が生じ、MDV抗原が発現されるが、産生されたウイルス粒子は非被覆（non-enveloped）であり、したがって、非感染性である（カルネックおよびウィッター、1991）。増殖制限感染の結果、マクロファージと顆粒球の浸透および脾臓腫脹（splenic enlargement）に導かれる細胞細胞の増生を伴ってBリンパ球が壊死する（ペイン等、1976）。結果として、T細胞が活性化され、MHCクラスII（Ia）抗原を発現する（シャット、1987）。休止T細胞ではなく、活性化されたT細胞は、MDVによる感染に感受性を有するようになる（カル

ネック等、1984、1985)。したがって、初期細胞溶解感染に関連する一過性免疫抑制はおそらく、脾臓およびのう(bursa)におけるB細胞の感染によるものである(シャット、1987)。

この段階に続いて、感染した鳥は潜伏感染として定義される第2段階に進む。感染T細胞内にウイルスゲノムは存在するが、この感染T細胞はウイルス抗原もウイルス粒子も産生しない。潜伏感染は、鳥の最初の感染から約6日後に確立される。

第3段階および最終段階は、第2細胞溶解感染、免疫抑制および腫瘍形成により特徴付けられる。この種の感染は、毒性血清型1ウイルスによりのみ生じる。第2の細胞溶解感染はF F Eにおいて生じ、これは感染細胞を含まないウイルスが産生される唯一の区域である。腫瘍形成におけるこの炎症感染の重要性は明らかではないが、潜在感染したリンパ球は、幼若化を経験するF F Eに引き付けられると考えられている。このことは腫瘍細胞中へのトランスフォーメーションのための必要条件となっている。さらに、非感染リンパ球は、腫瘍細胞に細胞溶解的に感染またはトランスフォーメーションする感染部位に引き付けられる(シャット、1987)。永久的な免疫抑制はしばしばこの時点で明らかとなる。潜在感染からの変化はまた、内臓器、神経、筋肉および皮膚における腫瘍形成により特徴付けられる(ペイン等、1976; ペイン、1985)。腫瘍細胞は今では多

くのMDV抗原を発現する。

ワクチンを使用する以前は、MDVは、家禽工業にとって経済的に重要な病気を構成した。現在のワクチンには3種類のものがある：(1)非常に弱毒化した血清型1ウイルス、(2)天然の無毒性血清型2ウイルス、または(3)血清学的に関連したHVTウイルス。最も効果的で最も広く用いられるのは、尾崎等により開発されたHVTワクチンである(1970)。現在のワクチン接種の戦略には、ワクチンの不適切な取扱い、母性抗体と関連ストレスによる干渉および同時感染によって発生した問題がある。さらに、HVTによる免疫化のみでは防御しない非常に毒性の強いMDV菌株が出現したことにより、ワクチンに多くの血清型を含むことになった(カルネックおよびウィッターにより調査された、1991)。

MDV単離体は、リンパ球のためのプレディレクション(predilection)に基づいてガンマヘルペスウイルスとして分類されている。しかしながら、近年では、MDVのゲノム構成を理解することに著しい努力が費される、ガンマヘルペスウイルスよりもアルファヘルペスウイルスとより遺伝的に相関性があることが明らかである(ロス等、1989、1991)。この手法を用いて、免疫応答を誘発するのに重要な多くの抗原を同定してきた。これらの抗原の中には、HSV 1 g B相同体(homolog)およびHSV g D相同体がある。HSV 1 g B相同体はロス等により同定され

た(1989)。他のヘルペスウイルス病において、g B糖タンパク質は、液性免疫応答および細胞媒介性免疫応答を誘発し、防御免疫を与えることが示されている(カンチス等、1987; マーチオリ等、1987; グオ等、1990)。MDV感染細胞においては、B抗原は、100 k D、60 k Dおよび49 k Dの分子量を有する糖タンパク質の複合体である(カルネックおよびウィッター、1991)。抗原は感染細胞の表面上と細胞室中に位置し(加藤および平井、1985)、中和抗体を誘発すると考えられる(小野等、1985)。同様に、HSV 1 g DのMDV相同体はロスおよびビンス(1991)並びにロス等(1991)により同定された。HSV g Dは、HSV感染に対する効果的な免疫原であることが示されている(パオレッティ等、1984; クレマー等、1985)。

MDVに対する現在のワクチン接種の戦略はきわめて成功しているが、現在のHVTワクチンにより適切には制御されない非常に毒性の強いMDV菌株が出現したことによって、ワクチン中に毒性の強い菌株の多数の免疫原を含有して広い免疫応答を付与し得ることが分かる。

したがって、MDV感染に対する防御免疫を供し、かつMDVの多数の免疫原が発現され得る組換え体を元としたワクチン、およびMDV組換えボックスウイルスを提供することが、現在の技術状態より優れた非常に望ましい進歩である。

#### 発明の目的

したがって本発明の目的は、MDVの遺伝子産生物を発現する組換えボックスウイルスを提供すること、並びにそのような組換えボックスウイルスを製造する方法を提供することにある。

本発明のさらなる目的は、MDV暗号配列、特に、ボックスウイルスベクター、特にワクシニアウイルスベクターまたは鶏痘ウイルスベクター中の、抗原的に適切なMDVからの糖タンパク質をコード化する配列のクローニングおよび発現を提供することにある。

本発明の別の目的は、MDV中和抗体およびMDV感染に対する防御免疫を誘発できるワクチンを提供することにある。

本発明のこれらと他の目的並びに利点は以下の内容を検討した後には容易に明らかとなる。

#### 発明の構成

ある実施態様において、本発明は、ボックスウイルスゲノムの可欠領域中にMDVからのDNA配列を含有する組換えボックスウイルスに関するものである。ボックスウイルスは好ましくはワクシニアウイルスまたは鶏痘ウイルスのようなアビボックスウイルスである。

本発明によると、組換えボックスウイルスは異種MDV遺伝子の遺伝子産生物を発現する。特に、異種DNAは、MDVからの構造タンパク質、特に抗原的に適切な糖タンパク質をコード化する。好ましくは、複数のMDV糖タン

バック質は組換えボックスウイルスにより宿主中で共発現される。

別の実施態様において、本発明は、ワクチンを接種した宿主動物中に免疫応答を誘発するワクチンであって、その可欠領域中にMDVからのDNAを含有する組換えボックスウイルスおよび担体を含むワクチンに関するものである。好ましくは、DNAはMDV構造タンパク質、特にMDV糖タンパク質を発現する。複数のMDV糖タンパク質は好ましくは宿主中で共感染される。本発明のワクチンに使用するボックスウイルスは好ましくは、ワクシニアウイルスまたは鶏痘ウイルスのようなアビボックスウイルスである。

#### 図面の簡単な説明

添付した図面を参照して、本発明をより理解する。

第1図は、チミジンキナーゼ遺伝子を欠失するためのプラスミドpSD460の構成方法および組換えワクシニアウイルスvP410の産生方法を模式的に示している。

第2図は、出血性領域を欠失するためのプラスミドpSD486の構成方法および組換えワクシニアウイルスvP553の産生方法を模式的に示している。

第3図は、AT1領域を欠失するためのプラスミドpMP494Δの構成方法および組換えワクシニアウイルスvP618の産生方法を模式的に示している。

第4図は、血球凝集素遺伝子を欠失するためのプラスミドpSD467の構成方法および組換えワクシニアウイルスvP723の産生方法を模式的に示している。

第5図は、遺伝子クラスター[C7L-K1L]を欠失するためのプラスミドpMPCSK1Δの構成方法および組換えワクシニアウイルスvP804の産生方法を模式的に示している。

第6図は、大型サブユニットであるリボヌクレオチドレダクターゼを欠失するためのプラスミドpSD548の構成方法および組換えワクシニアウイルスvP866(NYVAC)の産生方法を模式的に示している。

第7図は、対照群(接種または接触により抗原投与した)およびワクチン接種した群(vFP108によりワクチン接種し、接触により抗原投与した)についてのある期間に亘るニワトリの死亡率をプロットしたグラフ。

#### 発明の詳細な説明

本発明は、ボックスウイルスゲノムの可欠領域にMDVからのDNA配列を含有する組換えボックスウイルスに関するものである。組換えボックスウイルスは異種MDV遺伝子の遺伝子産物を発現する。特に、MDV構造タンパク質をコード化するMDV遺伝子を単離し、特徴付け、NYVAC(ワクシニアウイルス)組換え体およびTROVAC(鶏痘ウイルス)組換え体に挿入した。

#### 細胞系統およびウイルス菌株

F PV指定(designated)FP-1の菌株について前述している(テイラー等、1988a、b)。その菌株は、初生

ひなのワクチン接種に有用な弱毒ワクチン菌株である。親ウイルスであるデュベット菌株は、フランス国、リヨンのローン・メリュエクスから得た。ウイルス遺伝子学により得られたウイルスに4連続のブランク精製を施した。1つのブランク単離体を第1CEF細胞中でさらに増幅し、TROVACと称する保存ウイルス(stock virus)を産生した。

TROVACまたはTROVACベースの組換え体についての組換え試験、ブランク検定および増幅の全ては、SPF起源の生後10日から11日の感染幼虫包蔵卵から産生した第1CEF単層中で行なった。

MDV配列のレスキューとして使用したワクシニアウイルス菌株はNYVAC(vP866)であった。NYVACは、ウイルスの毒性および宿主範囲の制限を決定する際に用いられる18の読取り枠が欠失したことによりコペンハーゲン菌株から由来したワクシニアウイルスの非常に弱毒化された菌株である。組換え体のブランク選択およびウイルス増幅はウサギの腎臓細胞で行なった(RK13、ATCC CCL37)。

プラスミドpMDV517およびpUC13gBは、菌株RB1BからのMDV gDおよびgB糖タンパク質をコード化するDNA配列を含有している。プラスミドpUC13gBは、MDVのゲノムDNAの3.9 kbのDNA断片を含有している(菌株RB1B)。MDV gB遺伝子

を含有している断片をEcoRI-SalI断片としてpUC13中に挿入する。挿入した断片の配列はロス等の文献(1989)中に記載されている。プラスミドpMDV517は、MDVのゲノムDNAの5.2 kbのDNA断片を含有している(菌株RB1B)。MDV gD遺伝子を含有している断片をpUC13のEcoRI部位に挿入する。断片の配列はロス等の文献(1991)に記載されている。

#### 実施例1-弱毒ワクシニアワクチン菌株NYVAC

新しいワクシニアワクチン菌株を開発するために、既知のまたは潜在的な毒性因子をコード化するゲノムの6つの可欠領域を欠失することにより、ワクシニアウイルスのコペンハーゲンワクチン菌株を修飾した。連続的欠失を以下詳細に記載する。ワクシニア制限断片、読取り枠およびヌクレオチド位置の全ての命名は、ゲーベル等(1990a、b)に報告された用語法に基づいている。

異種遺伝子の挿入のための受容座として欠失座を作成した。

NYVAC中で連続的に欠失した領域を以下に列記する。省略型および欠失領域の読取り枠の名称(ゲーベル等、1990a、b)並びに記載した欠失による全ての欠失を含有するワクシニア組換え体(vP)の名称もまた列記する。

#### (1) チミジンキナーゼ遺伝子

(TK; J2R) vP410;

#### (2) 出血領域

- (u : B13R+B14R) v P553 ;
- (3) A型封入体領域  
(ATI : A26L) v P618 ;
- (4) 血球凝集素遺伝子  
(HA : A56R) v P723 ;
- (5) 宿主範囲遺伝子領域  
(C7L-K1L) v P804 ; および
- (6) 大型サブユニット、リボヌクレオチド レダクターゼ  
(I4L) v P866 (NYVAC)。

#### DNAクローニングおよび合成

プラスミドを標準方法により構成し、スクリーニングし、成長させた(マニアチス等、1982; パーカス等、1985; ビッチーニ等、1987)。制限エンドヌクレアーゼを、メアリランド州、ゲイサースバーグのギブコ/BRL; マサチューセッツ州、ビバリーのニュー イングランド バイオラボ; およびインディアナ州、インディアナポリスのベーリンガー マイハイム バイオケミカルから得た。E. coli ポリメラーゼのクレノウ断片をベーリンガー マイハイム バイオケミカルから得た。BAL-31 エキソヌクレアーゼおよびファージT4 DNAリガーゼをニュー イングランド バイオラボから得た。各々の供給元による指定にそって試薬を用いた。

前述したようにバイオサーチ8750または応用バイオ

システムス380B DNAシンセサイザーを用いて、合成オリゴデオキシリボヌクレオチドを調製した(パーカス等、1989)。前述したように(グオ等、1989)シーケナーゼ(タボア等、1987)を用いてジデオキシ鎖終止法(サンガー等、1977)によりDNA塩基配列決定を行なった。自動パーキン エルマー セタスDNAサーマル サイクル中で注文合成オリゴヌクレオチド プライマーおよびジェネアンブDNA増幅試薬キット(コネチカット州、ノルウォークのパーキン エルマー セタス)を用いて、配列確認のためにポリメラーゼ連鎖反応(PCR)によるDNA増幅を行なった。制限エンドヌクレアーゼ切断と続いてのBAL-31エキソヌクレアーゼによる制限切断および合成オリゴヌクレオチドを用いた突然変異誘発(マンデッキ、1986)によりプラスミドから過剰のDNA配列を欠失した。

#### 細胞、ウイルス、およびトランスフェクション

ワクシニアウイルスのコペンハーゲン菌株の培養条件および起源は前述してある(グオ等、1989)。組換え、ニトロセルロース フィルタのその場での繊維形成およびB-ガラクトシダーゼ活性のスクリーニングによる組換えウイルスの産生は以前に記載している(パニカリ等、1982; パーカス等、1989)。

チミジン キナーゼ遺伝子(J2R)を欠失するためのプラスミドpSD460の構成

第1図を参照する。プラスミドpSD406はpUC8にクローニングされたワクシニアHindIII J (位置83,359-88,377)を含有している。pSD406をHindIIIおよびPvuIIで切断し、HindIII/SmaIで切断したpUC8中にHindIII Jの左側からの1.7 kb断片をクローニングし、pSD447を形成した。pSD447はJ2R (位置83,855-84,385)の完全な遺伝子を含有している。開始コドンはNlaIII部位内に含まれており、終止コドンはSspI部位内に含まれている。転写の方向は第1図の矢印により示している。

左側のフランキンゲンアームを得るために、pSD447から0.8 kbのHindIII/EcoRI断片を単離して、次いでNlaIIIで切断し、0.5 kbのHindIII/NlaIII断片を単離した。アニールした合成オリゴヌクレオチドMPSYN43/MPSYN44 (配列認識番号1/配列認識番号2)

MPSYN43 5' TAATTAAGCTACCGGG 3'  
MPSYN44 3' GTACATTAATTGATGATGGGCCCTTAA 5'  
NlaIII EcoRI

を、0.5 kbのHindIII/NlaIII断片と連結してHindIII/EcoRIで切断したpUC18ベクタープラスミド中にクローニングし、プラスミドpSD449を産生した。

ワクシニア右側フランキンゲンアームおよびpUCベクター配列を含有する制限断片を得るために、pSD447をワクシニア配列内のSspI (部分的) およびpUC/ワクシニア接合部でのHindIIIで切断し、2.9 kbのベクター断片を単離した。このベクター断片をアニールした合成オリゴヌクレオチドMPSYN45/MPSYN46 (配列認識番号3/配列認識番号4)

HindIII SmaI  
MPSYN45 5' AGCTTCCCGGGTAAGTAATACGTCAAGGAGAAAACGAA  
MPSYN46 3' AGGGCCCATTCATTATGCAGTCTCTTTTGCTT

NotI SspI  
ACGATCTGTAGTTAGCGCGCCTAATTAATAAT 3'  
MPSYN45 TGCTAGACATCAATCGCGGCGGATTAATTGATTA 5'  
MPSYN46

に連結し、pSD459を産生した。

左側フランキンゲンアームと右側フランキンゲンアームを1つのプラスミド中に結合させるために、0.5 kbのHindIII/SmaI断片をpSD449から単離して、HindIII/SmaIで切断したpSD459ベクタープラスミドと連結し、プラスミドpSD460を産生した。pSD460を、野生型ワクシニアウイルスコペンハーゲン菌株VC-2の供与体プラスミドとして用いた。テンプレートとしてMPSYN45 (配列認識番号3) およびプライマーとして補体20merオリゴヌクレオチド MPSYN47 (配列認識番号5) (5' TTAGTTAA

TTAGGCGGCTGC3')を用いたプライマー延長により、<sup>32</sup>P標識プローブを合成した。組換えウイルスvP410をブラック腫瘍形成により同定した。

出血性領域(B13R+B14R)を欠失するためのプラスミドpSD486の構成

ここで第2図を参照する。プラスミドpSD419はpUC8中にクローニングされたワクシニアSa11 G (位置160.744-173.351)を含有している。pSD422はpUC8中にクローニングされた、右側に接触したワクシニアSa11断片、Sa11 J (位置173.351-182.746)を含有している。出血性領域であるu、B13R-B14R (位置172.549-173.552)の欠失したプラスミドを構成するために、pSD419を左側フランキングアームの供給源として用い、pSD422を右側フランキングアームの供給源として用いた。u領域の転写方向は第2図の矢印により示している。

好ましくない配列をpSD419から除去するために、pSD419をNcoI/SmaIで切断し、続いてE. coliポリメラーゼのクレノウ断片でプラントエンドとして連結し、プラスミドpSD476を産生することにより、NcoI部位(位置172.253)の左側の配列を除去した。pSD422をB14Rの終止コドンでのHpaIにより切断し、右側に0.3 kbのNruIで切断することにより、ワクシニア右側フランキングアームを得た。この0.

vP533からベクターガラクトシダーゼ配列を除去するために、ポリリンカー領域を含有するがu欠失接合部に開始コドンを含むpSD477の誘導体であるプラスミドpSD486を用いた。最初に、上述したpSD477からのClaI/HpaIベクター断片をアニールした合成オリゴヌクレオチドSD42mer/SD40mer (配列認識番号8/配列認識番号9)

ClaI      SacI      XhoI      HpaI  
 SD42mer 5' CGATTACTAGATCTGAGCTCCCGGGCTCGAGGATCCGTT 3'  
 SD40mer 3' TAATGATCTAGACTCGAGGGGCCCGAGCTCCCTAGGCAA 5'  
           BglII      SmaI      BamHI

と連結し、プラスミドpSD478を産生した。次に、pSD478をEcoRIで切断し、続いてE. coliポリメラーゼのクレノウ断片でプラントエンドとし、連結してプラスミドpSD478E<sup>-</sup>を産生することにより、pUC/ワクシニア接合部でのEcoRI部位を破壊した。pSD478E<sup>-</sup>をBamHIとHpaIで切断し、アニールした合成オリゴヌクレオチドHEM5/HEM6 (配列認識番号10/配列認識番号11)

BamHI EcoRI HpaI  
 HEM5 5' GATCCGAATTCAGCT 3'  
 HEM6 3' GCTTAAGATCGA 5'

と連結し、プラスミドpSD486を産生した。組換えワクシニアウイルスvP533による組換えのために供与体プラスミドとしてpSD486を用いて、vP553を産

3 kb断片を単離し、pSD476から単離した3.4 kbのHincIベクター断片と連結し、プラスミドpSD477を産生した。pSD477中でワクシニアu領域が部分的に欠失した位置を三角形により示している。pSD477中の残りのB13R暗号配列を、ClaI/HpaIで切断することにより除去し、生成したベクター断片をアニールした合成オリゴヌクレオチドSD22mer/SD20mer (配列認識番号6/配列認識番号7)

ClaI      BamHI HpaI  
 SD22mer 5' CGATTACTATGAAGGATCCGTT 3'  
 SD20mer 3' TAATGATATTCTCTAGGCAA 5'

と連結し、pSD479を産生した。pSD479はBamHI部位の後に開始コドン(下線)を含有している。uプロモーターのコントロール下でB13-B14(u)欠失座にE. coliベクターガラクトシダーゼを配するために、ベクターガラクトシダーゼ遺伝子を含有する3.2 kbのBamHI断片(シャピラ等、1983)をpSD479のBamHI部位に挿入し、pSD479BGを産生した。ワクシニアウイルスvP410による組換えのための供与体プラスミドとしてpSD479BGを用いた。色素基質X-galの存在下で組換えワクシニアウイルスvP533をブルーブラックとして単離した。vP533において、B13R-B14R領域が欠失しており、ベクターガラクトシダーゼにより置き換えられている。

生した。vP553はX-galの存在下で透明ブラックとして単離した。

AT1領域(A26L)を欠失するためのプラスミドpMAP494Δの構成

ここで第3図を参照する。pSD414はpUC8中にクローニングされたSa11 Bを含有している。A26L領域の左側の好ましくないDNA配列を除去するために、pSD414をワクシニア配列内のXbaI (位置137.079)およびpUC/ワクシニア接合部でのHindIIIで切断し、E. coliポリメラーゼのクレノウ断片でプラントエンドとし、連結してプラスミドpSD483を産生した。A26L領域の右側の好ましくないワクシニアDNA配列を除去するために、pSD483をEcoRI (位置140.665 およびpUC/ワクシニア接合部)で切断して連結し、プラスミドpSD484を産生した。A26L暗号領域を除去するために、pSD484を、A26L ORF (位置139.004)からわずかに上流のNdeI (部分的)およびA26L ORFからわずかに下流のHpaI (位置137.889)で切断した。5.2 kbのベクター断片を単離し、アニールした合成オリゴヌクレオチドAT13/AT14 (配列認識番号12/配列認識番号13)

NdeI  
 AT13 5' TATGAGTAACCTTAACCTCTTTTGTAAATTAAGTATATTCAAAAATAAGT  
 AT14 3' ACTCATTTGAATTGAGAAACAAATTAATTTTCATATAAGTTTTTATTCA

BglII EcoRI HpaI  
 TATATAATAGATCTGAATTCGTT 3' AT13  
 ATATATTTATCTAGACTTAAGCAA 5' AT14



と連結し、A26Lの上流の領域を再構成し、A26L ORFを、上述した制限部位BglIII、EcoRIおよびHpaIを含有する短いポリリンカー領域で置き換えた。産生したプラスミドをpSD485と称した。pSD485のポリリンカー領域中のBglIIIとEcoRI部位は固有のものではないので、pUC/ワクシニア接合部でのEcoRIおよびBglIII（位置140,136）で切断し、続いてE. coliポリメラーゼのクレノウ断片でプラントエンドとして連結することにより、プラスミドpSD483（上述）からBglIII部位およびEcoRI部位を除去した。生成したプラスミドをpSD489と称した。A26L ORFを含有するpSD489からの1.8 kbのClaI（位置137,198）/EcoRV（位置139,048）断片を、pSD485からのClaI/EcoRV断片を含有する対応0.7 kbポリリンカーと置き換えて、pSD492を産生した。pSD492のポリリンカー領域におけるBglIIIおよびEcoRIは固有のものである。

ワクシニア11kDaのプロモーターのコントロール下で（パーソレット等、1985；パークス等、1990）E. coliベクターガラクトシダーゼ遺伝子を含有する3.3 kbのBglIIIカセットをpSD492のBglIII部位に挿入し、pSD493KBGを形成した。レスキューウイルスvP553による組換えにプラスミドpSD493KBGを用いた。A26L欠失領域にベクターガラクトシダ

ーゼを含有する組換えワクシニアウイルスvP581をX-galの存在下でブルーブラックとして単離した。

ワクシニア組換えウイルスvP581からベクターガラクトシダーゼ配列を除去するためのプラスミドを産生するために、合成オリゴヌクレオチドMP5YN177（配列認識番号14）

(5' AAAATGGGCGTGGATTGTTAACTTTATATACTTATTTTGAATATAC 3')を用いた突然変異誘発（マンデッキ、1986）によりプラスミドpSD492のポリリンカー領域を欠失した。産生したプラスミドpMP494Δにおいて、完全なA26L ORFを含有するワクシニアDNA包含位置[137,889 - 138,937]を欠失する。ベクターガラクトシダーゼ含有ワクシニア組換え体vP581とpMP494Δとの間の組換えの結果として、ワクシニア欠失変異体vP618が産生され、X-galの存在下で透明ブラックとして単離した。

#### 血球凝集素遺伝子(A56R)を欠失するためのプラスミドpSD467の構成

ここで第4図を参照する。ワクシニアSalI G制限断片（位置160,744 - 173,351）はHindIII A/B接合部（位置162,539）と交差している。pSD419はpUC8にクローニングされたワクシニアSalI Gを含有している。血球凝集素(HA)遺伝子の転写方向を第4図の矢印により示す。pSD419をワクシニア配列

内とpUC/ワクシニア接合部でのHindIIIにより切断し、続いて連結することにより、HindIII Bから誘導したワクシニア配列を除去した。生成したプラスミドpSD456は、0.4 kbのワクシニア配列を左側と右側の側面にそれぞれ有するHA遺伝子A56Rを含有している。pSD456をA56R暗号配列から上流のRsaI（部分的；位置161,090）およびこの遺伝子の末端近くのEagI（位置162,054）で切断することによりA56R暗号配列を除去した。pSD456から3.6 kbのRsaI/EagIベクター断片を単離し、アニールした合成オリゴヌクレオチドMP5YN59（配列認識番号15）、MP5YN62（配列認識番号16）、MP5YN60（配列認識番号17）、およびMP5YN61（配列認識番号18）

**BsaI**  
MP5YN59 5' ACACGAATGATTTTCTAAAGTATTTGGAAAGTTTATAGGTAGTTGATAGA-  
MP5YN62 3' TGTGCTTACTAAAAGATTTCATAAACCTTTCAAAATATCCATCAACTATCT 5'  
MP5YN59 -ACAAAATACATAATTT 3'

**BglII**  
MP5YN60 5' TGTAAAAATAAAATCACTTTTATACTAAGATCT-  
MP5YN61 3' TGTGTTTATGTATTAAACATTTTATTTAGTGAAAAATATGATTCTAGA-

**SmaI BglI EagI**  
MP5YN60 -CCCGGGCTGCAGC 3'  
MP5YN61 -GGGCCCGACGTCGCCGG 5'

と連結し、A56R ORFから上流のDNA配列を再構成し、A56R ORFを上述したポリリンカー領域と置

き換えた。産生したプラスミドはpSD466である。pSD466中のワクシニア欠失は、位置[161,185 - 162,053]を包含している。pSD466中の欠失部位は第4図の三角形により示している。

ワクシニア11kDaプロモーターのコントロール下で（パーソレット等、1985；グオ等、1989）E. coliベクターガラクトシダーゼを含有している3.2 kbのBglIII/BamHI（部分的）（シャピラ等、1983）をpSD466のBglIII部位に挿入し、pSD466KBGを形成した。プラスミドpSD466KBGはレスキューウイルスvP618による組換えに用いた。A56Rが欠失している部位にベクターガラクトシダーゼを含有する組換えワクシニアウイルスvP708をX-galの存在下でブルーブラックとして単離した。

供与体プラスミドpSD467を用いてベクターガラクトシダーゼ配列をvP708から欠失した。pSD466をEcoRI/BamHIで切断し、続いてE. coliポリメラーゼのクレノウ断片でプラントエンドとして連結したことにより、EcoRI、SmaIおよびBamHI部位がpUC/ワクシニア接合部から除去されていることを除いては、pSD467はpSD466と同一である。vP708とpSD467との間の組換えの結果として、組換えワクシニア欠失変異体vP723を得た。vP723は、X-galの存在下で透明ブラックとして単離した。

採取用 [C7L-K1L] を欠失するためのプラスミド pMPCSK1Δ の構成

ここで第5図を参照する。pMPCSK1Δの構成に、以下のワクシニアクローンをを用いた。pSD420はpUC8にクローニングされたSalIHである。pSD435はpUC18にクローニングされたKpnIFである。pSD435をSphIで切断し、再連結してpSD451を形成した。pSD451において、HindIII M中のSphI部位(位置27,416)の左側のDNA配列は除去されている(パークス等、1990)。pSD409はpUC8にクローニングされたHindIIIMである。

ワクシニアから[C7L-K1L]遺伝子クラスターを欠失するための基質を用意するために、以下のようにE. coliベクターガラクトシダーゼを最初にワクシニアM2L欠失座(グオ等、1990)に挿入した。pSD409中のBgIII部位を除去するために、プラスミドをワクシニア配列中のBgIII(位置28,212)およびpUC/ワクシニア接合部でのBamHIで切断し、連結してプラスミドpMP409Bを形成した。pMP409Bを固有のSphI部位(位置27,416)で切断した。合成オリゴヌクレオチド

BgIII

MPSYN82 (SEQ ID NO:19) 5'  
TTTCTGTATATTGACCAATTAGATCTTACTCAAAA  
TATGTAAACAATA 3'

oRV(位置29,778)で切断することにより得た。生成したプラスミドpMP581CKは、HindIIIC中のBgIII部位(位置19,706)とHindIIIK中のBgIII部位(位置29,062)との間のワクシニア配列が欠失している。プラスミドpMP581CK中のワクシニア配列が欠失している部位を第5図に三角形により示している。

ワクシニア欠失接合部で過剰のDNAを除去するために、プラスミドpMP581CKをワクシニア配列内のNcoI部位(位置18,811;19,655)で切断し、BamHI-31エキソヌクレアーゼで処理し、これに合成オリゴヌクレオチドMPSYN233(配列認識番号20)

5' TGTCATTAACTACTATCTATTAATAAAAAATAATTTATT 3'

を用いた突然変異誘発(マンデッキ、1986)を施した。生成したプラスミドpMPCSK1Δは、12ワクシニア採取用[C7L-K1L]を包含しているワクシニア配列位置18,805-29,108が欠失している。ワクシニア組換え体vP784を含有するベクターガラクトシダーゼとpMPCSK1Δとの間の組換えの結果として、ワクシニア欠失変異体vP804が得られた。vP804は、X-galの存在下で透明ブラックとして単離した。

大型サブユニットであるリボヌクレオチド レダクターゼ(I4L)を欠失するためのプラスミドpSD548の構成

を用いた突然変異誘発(グオ等、1990;マンデッキ、1986)によりM2L暗号配列を除去した。生成したプラスミドpMP409Dは、上述したようにM2L欠失座に挿入された固有のBgIII部位を含有している。11kDaのプロモーターのコントロール下で(パーソレット等、1985)E. coliベクターガラクトシダーゼを含有する3.2kbのBamHI(部分的)/BgIIICセットを、BgIIIで切断したpMP409Dに挿入した。レスキューワクシニアウイルスvP723による組換えのための供与体プラスミドとして、生成したプラスミドpMP409DBG(グオ等、1990)を用いた。M2L欠失座に挿入されたベクターガラクトシダーゼを含有する組換えワクシニアウイルスvP784を、X-galの存在下でブルーブラックとして単離した。

ワクシニア遺伝子[C7L-K1L]が欠失したプラスミドをSmaIおよびHindIIIで切断したpUC8中に組み入れて、E. coliポリメラーゼのクレノウ断片でプラントエンドとした。ワクシニアHindIIIC配列からなる左フランキンガームを、pSD420をXbaI(位置18,628)で切断し、続いてE. coliポリメラーゼのクレノウ断片でプラントエンドとし、BgIII(位置19,706)で切断することにより得た。ワクシニアHindIIIK配列からなる右フランキンガームを、pSD451をBgIII(位置29,062)およびEc

ここで第6図を参照する。プラスミドpSD405は、pUC8中にクローニングされたワクシニアHindIII(位置63,875-70,367)を含有している。pSD405をワクシニア配列内のEcoRV(位置67,933)およびpUC/ワクシニア接合部でのSmaIで切断し、連結してプラスミドpSD518を形成した。pSD548の構成に用いた全てのワクシニア制限断片の供給源としてpSD518を用いた。

ワクシニアI4L遺伝子は位置67,371-65,059におよんでいる。I4Lの転写方向を第6図の矢印により示す。I4L暗号配列の部分が欠失したベクタープラスミド断片を得るために、pSD518をBamHI(位置65,381)およびHpaI(位置67,001)で切断し、E. coliポリメラーゼのクレノウ断片を用いてプラントエンドとした。この4.8kbのベクター断片を、ワクシニア11kDaプロモーターのコントロール下で(パーソレット等、1985;パークス等、1990)E. coliベクターガラクトシダーゼ遺伝子を含有する3.2kbのSmaIカセット(シャピラ等、1983)と連結して、プラスミドpSD524KBGを形成した。ワクシニアウイルスvP804による組換えのための供与体プラスミドとしてpSD524KBGを用いた。I4L遺伝子が部分的に欠失した位置にベクターガラクトシダーゼを含有する組換えワクシニアウイルスvP855を、X-galの存在下でブルーブラックとして単

離した。

v P 8 5 5 から I 4 L O R F の残りの部分およびベクターガラクトシダーゼを欠失するために、欠失プラスミド p S D 5 4 8 を構成した。以下に記載するように、左右のワクシニアフランキングアームを別々に p U C 8 中に組み入れ、模式的に第 6 図に示した。

左側ワクシニアフランキングアームを受容するベクタープラスミドを構成するために、p U C 8 を B a m H I / E c o R I で切断し、アニールした合成オリゴヌクレオチド 5 1 8 A 1 / 5 1 8 A 2 (配列認識番号 2 1 / 配列認識番号 2 2)

BamHI RsaI  
518A1 5' GATCCTGAGTACTTTGTAAATATAATGATATATATTTTCACTTTATCTCAT  
518A2 3' GACTCATGAAACATTATATTACTATATATAAAAGTGAAATAGAGTA

BglII EcoRI  
TTGAGAATAAAAAGATCTTAGG 3' 518A1  
AACTCTTATTTTCTAGAATCCTTAA 5' 518A2

と連結し、プラスミド p S D 5 3 1 を形成した。p S D 5 3 1 を R s a I (部分的) および B a m H I で切断し、2.7 k b のベクター断片を単離した。p S D 5 1 8 を B g l I I (位置 64,459) / R s a I (位置 64,994) で切断し、0.5 k b の断片を単離した。2つの断片を共に連結して、p S D 5 3 7 を形成した。p S D 5 3 7 は、I 4 L 暗号配列の左側の完全なワクシニアフランキングアームを含有している。

右側ワクシニアフランキングアームを受容するベクター

プラスミドを構成するために、p U C 8 を B a m H I / E c o R I で切断し、アニールした合成オリゴヌクレオチド 5 1 8 B 1 / 5 1 8 B 2 (配列認識番号 2 3 / 配列認識番号 2 4)

BamHI BglII SmaI  
518B1 5' GATCCAGATCTCCCGGAAAAAATTATTTAACTTTTCATTAAATAGGGATT  
518B2 3' GTCTAGAGGGCCCTTTTAAATAAATGAAAAAGTAATTATCCCTAAA

RsaI EcoRI  
GACGTATGTAGCGTACTAGG 3' 518B1  
CTGCATACTACGCATGATCCTTAA 5' 518B2

と連結して、プラスミド p S D 5 3 2 を形成した。p S D 5 3 2 を R s a I (部分的) / E c o R I で切断し、2.7 k b のベクター断片を単離した。p S D 5 1 8 をワクシニア配列内の R s a I (位置 67,436) およびワクシニア / p U C 接合部での E c o R I により切断し、0.6 k b の断片を単離した。2つの断片をともに連結して、I 4 L 暗号配列の右側の完全なワクシニアフランキングアームを含有している p S D 5 3 8 を形成した。

右側ワクシニアフランキングアームを p S D 5 3 8 から 0.6 k b の E c o R I / B g l I I 断片として単離し、E c o R I / B g l I I で切断した p S D 5 3 7 ベクタープラスミド中に連結した。生成したプラスミド p S D 5 3 9 において、全て p U C のバックグランドで左右それぞれの側面に 0.6 k b のワクシニア DNA を有するポリリンカー領域により I 4 L O R F (位置 65,047-67,386) を置

き換えた。ワクシニア配列内の欠失部位を第 6 図において三角形により示す。p S D 5 3 9 の p U C 誘導部分におけるベクターガラクトシダーゼ配列の組換えワクシニアウイルス v P 8 5 5 中のベクターガラクトシダーゼ配列による可能性のある組換えを避けるために、ワクシニア I 4 L 欠失カセットを p S D 5 3 9 から p R C 1 1 中に移動した。この p R C 1 1 は、全てのベクターガラクトシダーゼを除去し、ポリリンカー領域により置き換えた p U C の誘導体である (コリナス等、1990)。p S D 5 3 9 を E c o R I / P s t I で切断し、1.2 k b の断片を単離した。この断片を E c o R I / P s t I で切断した p R C 1 1 (2.35 k b) に連結し、p S D 5 4 8 を形成した。p S D 5 4 8 とベクターガラクトシダーゼ含有ワクシニア組換え体 v P 8 5 5 との間の組換えの結果として、ワクシニア欠失変異体 v P 8 6 6 が得られた。v P 8 6 6 は、X-gal の存在下で透明ブラックとして単離した。

組換えワクシニアウイルス v P 8 6 6 からの DNA を、制限切断と続いてのアガロースゲル上の電気泳動により分析した。制限模様は予期したものであった。テンプレートとしての v P 8 6 6 および上述した 6 つの欠失座を側面に有する (flanking) プライマーを用いたポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) (ニゲルケ等、1988) により、予期したサイズの DNA 断片を産生した。欠失接合部の区域の周りの PCR 産生断片の配列分析により、接合部が予期したも

のであることを確認した。上述したような 6 つの作成欠失部を含有する組換えワクシニアウイルス v P 8 6 6 を、ワクシニアワクチン菌株「NYVAC」と称した。

#### 実施例 2 - プラスミドの構成

##### F 8 座での親痘挿入プラスミドの構成

プラスミド p R W 7 3 1. 15 は T R O V A C ゲノム DNA からクローニングした 10 k b の P v u I I - P v u I I 断片を含有している。ヌクレオチド配列を 3660 b p の P v u I I - E c o R V 断片の両方の鎖について決定した。この配列は以下のとおりである (配列認識番号 2 5)

1 GATATCTGTG GTCTATATAT ACTACACCCT ACCGATATTA ACCAACGAGT  
TTCTCACAAAG  
61 AAAACTTGT TAGTAGATAG AGATTCTTTG ATTGTGTTTA AAAGAAGTAC  
CAGTAAAAAG  
121 TGTGGCATAT GCATAGAAGA AATAAACAAA AAACATATTT CCGAACAGTA  
TTTTGGAATT  
181 CTCCCAAGTT GTAAACATAT TTTTGCCTA TCATGTATAA GACGTTGGGC  
AGATACTACC  
241 AGAAATACAG ATACTGAAAA TACGTGCTCT GAATGTAGAA TAGTTTTTCC  
TTTCATAATA  
301 CCCAGTAGGT ATTGGATAGA TAATAAATAT GATAAAAAAA TATTATATAA  
TAGATATAAG  
361 AAAATGATTT TTACAAAAAT AACCTATAAG AACAAATAAA ATATAATTAC  
ATTTACGGAA  
421 AATAGCTGGT TTTAGTTTAC CAACCTAGAG TAATTATCAT ATTGAATCTA  
TATTGTTTTT  
481 TAGTTATATA AAAACATGAT TAGCCCCCAA TCGGATGAAA ATATAAAAAA  
TGTTGAGAAT  
541 TTCGAATACA AAAAAAGAG GAATCGTACG TTGTCCATAT CCAAACATAT  
AAATAAAAAAT

59: TCAAAAGTAG TATTACTG GATGTTAGA GATCAACGTG TACAAGATAA  
TTGGGTTTA  
66: ATTACGCCAC AACGATTAGC GTTAAACTC AAAATACCTC TAAGATATG  
CTTTGTGTC  
72: GTGCCAAAT TACACACTAC TACTTCTAGA CACTTTATGT TTTAATATC  
CGGTCTTAA  
78: GAAGTCGCGG AAGATGTAA AAGACTATGT ATAGGGTTTT CATGTATATA  
TGGCGTACCA  
84: AAGTAATAA TTCCGTGTAT AGTAAAAAA TACAGAGTCG GAGTAATCAT  
AACGGATTTC  
90: TTTCATTAC GTGTCCCGA AAGATTAATG AACAGACTG TAATATCTCT  
TCCAGATAAC  
96: ATACCTTTA TACAAGTAGA CGCTCATAAT ATAGTACCTT GTTGGGAAGC  
TTCTGATAAA  
102: GAAGATACG GTGCACGAAC TTTAAGAAAA AAGATATTG ATAATTATA  
TGAATATATG  
108: ACAGAAATTC CTGTGTTGCG TAAACATCCA TACGGTCCAT TTTCTATATC  
TATTGCAAAA  
114: CCCAAAAATA TATCATTAGA CAAGACGGTA TTACCCGTAA AATGGGCAAC  
GCCTGGAACA  
120: AAAGTGGAA TAATTGTTTT AAAAGAATT ATAAAAACA GATTACCGTC  
ATACGACGGC  
126: GATCATAACA ATCCTACGTG TGACGCTTTG AGTAACTTAT CTCCTGGCT  
ACATTTTGGT  
132: CATGTATCCG CACAACGTGT TGCCTTAGAA GTATTAAAT GTATACGAGA  
AAGCAAAAA  
138: AACGTTGAAA CGTTTATAGA TGAATAATT GTAAGAAGAG AACTATCGGA  
TAATTTTTGT  
144: TACTATAACA AACATTAGA TAGTATCCAG TCTACTCATT CATGGGTTAG  
AAAAACATTA  
150: GAAGATCACA TTAATGATCC TAGAAAGTAT ATATATTCCA TTAACAACCT  
CGAAAAAGCG  
156: GAAACTCATG ATCCTCTATG GAACGCGTCA CAAATGCAGA  
TGGTGAGAGA AGGAAAAATG  
162: CATAGTTTT TACGAATGTA TTGGGCTAAG AAGATACTTG AATGGACTAG  
AACACCTGAA  
168: GACGCTTTGA GTTATAGTAT CTATTTGAAC AACAGTACG AACTAGACGG  
CACGGATCCT  
174: AACGGATACG TAGGTTGTAT GTGGTCTATT TCGGATTAC ACGATAGAGC  
GTGGAAAGCA  
180: AGACCGATAT TTGAAAGAT AAGATATATG AATTATGAGA GTTCTAAGAA  
GAAATTTGAT  
186: GTTGTGTAT TTATACAGAA ATACAATAA GATAAATAAT ATACAGCATT  
GTAACCATCG  
192: TCATCCGTTA TACGGGGAAT AATATTACCA TACAGTATTA TTAATTTTC  
TTACGAAGAA  
198: TATAGATCGG TATTTATCGT TAGTTTATT TACATTTATT AATTAACAT  
GTCTACTATT  
204: ACCTGTTATG GAAATGACAA ATTTAGTTAT ATAATTTATG ATAAAAATTA  
GATAATAATA  
210: ATGAATCAA ATAATTATGT AAATGCTACT AGATTATGTG AATTACGAGG  
AAGAAAGTTT

216: ACGAACTGGA AAAAATTAA TGAATCTAAA ATATTAGTCG ATAATGTAAA  
AAAAATAAT  
222: GATAAACTA ACCAGTAAA AACGGATATG ATTATATACG TTAAGGATAT  
TGATCATAAA  
228: GGAAGAGATA CTTCGGTTA CTATGTACAC CAAGATCTGG TATCTTCTAT  
ATCAAAATGG  
234: ATATCTCCGT TATTCGCGT TAAGGTAAT AAAATTATTA ACTATTATAT  
ATGTAATGAA  
240: TATGATATAC GACTTAGCGA AATGGAATCT GATATGACAG AAGTAATAGA  
TGATTTGAT  
246: AAATAGTAG GAGGATACAA TGATGAAATA GCAGAAATA TATATTGTT  
TAATAAATT  
252: ATAGAAAAAT ATATTGCTAA CATATCGTTA TCACTGAAT TATCTAGTAT  
ATTAATAAT  
258: TTTATAAATT TTATAAATT TAATAAAAA TACAATAACG ACATAAAGAT  
ATTTAATCTT  
264: TAATCTTGA TCTGAAAAAC ACATCTATAA AACTAGATAA AAAGTTATTC  
GATAAAGATA  
270: ATAAAGATC GAACGATGAA AAATTGGAAG CAGAAGTTGA TAAGCTAATT  
TTTTCTCT  
276: AAATAGTATT ATTTTATGTA AGTACGAAGT TTTACGTTAG ATAAATAA  
AAGGTCGATT  
282: TTTACTTTGT TAAATATCAA ATATGTCATT ATCTGATAAA GATACAAAA  
CACACGGTGA  
288: TTATCAACCA TCTAACGAAC AGATATTACA AAAAATACGT CGGACTATGG  
AAAACGAAGC  
294: TGATGCTCTC AATAGAAGAA GCATTAAAGA AATTGTTGTA GATGTTATGA  
AGAAATGGGA  
300: TCATCCTCAA CGAAGAAATA GATAAAGTTC TAACTGGAA AATGATACA  
TTAAACGATT  
306: TAGATCATCT AAATACAGAT GATAATATTA AGGAAATCAT ACAATGTCTG  
ATTAGAGAAT  
312: TTGCGTTTAA AAAGATCAAT TCTATTATGT ATAGTTATGC TATGTTAAAA  
CTCAATTCAG  
318: ATAACGAACA TTGAAAGATA AAATTAAGGA TTATTTTATA GAAACTATTC  
TTAAAGACAA  
324: ACGTGGTTAT AAACAAAAGC CATTACCCGG ATTGGAAGT AAAACTAGT  
ATAGTATTAT  
330: AAGATTTTAA AAACATAAAA TTAATAGGTT TTTATAGATT GACTTATTAT  
ATACAATATG  
336: GATAAAGAT ATATATCAAC TAGAAAGTTG AATGACGGAT TCTTAATTTT  
ATATTATGAT  
342: TCAATAGAAA TTATTGTCAT GTCGTGTAAT CATTTTATAA ATATATCAGC  
GTCTACTAGT  
348: AAGAAAAACA AGGACTTTAA TGAATGGCTA AAGATAGAAT CATTTAGAGA  
AATAATAGAT  
354: ACTTTAGATA AAATTAATTA CGATCTAGGA CAACGATATT GTGAAGAACT  
TACGGCGCAT  
360: CACATTCAG TGTAATTATT GAGGTCAAAG CTAGTAACCT AATAGATGAC  
AGGACAGCTG

F8と称した読取り枠の制限をこの配列内で決定した。  
位置496で読取り枠は開始し、位置1887で終止する。以下  
に記載するように、位置780から位置1927までの欠失部を  
作成した。

プラスミドpRW761は、2429bpのEcoRV-E  
coRV断片を含有するpRW731.15のサブクロー  
ンである。プラスミドpRW761を完全にXbaIで切  
断し、SspIで部分的に切断した。3700bpのXbaI  
-SspIバンドを単離し、アニールした二重鎖オリゴ  
ヌクレオチドJCA017（配列認識番号26）およびJC  
A018（配列認識番号27）

JCA017:  
CTAGACACTTTATGTTTTTAATATCCGGTCTTAAAGCTTCCCGGGGATCCTTA  
TACGGGGAATAAT 3'

JCA018:  
ATTATTTCCCGTATAAGGATCCCCGGGAAGCTTTTAAAGCCGGATATTAATAA  
CATAAAGTGT 3'

と連結した。

この連結により生成したプラスミドをpJCA002と  
称した。

アニールしかつキナーゼした(kinased)オリゴヌクレ  
オチドCE205（配列認識番号28）およびCE206  
（配列認識番号29）

CE205:  
GATCAGAAAACTAGCTAGCTAGTACGTAGTTAACGTCGACCTGCAGAAAGCTTCT  
AGCTAGCTAGTTTTAT

CE206:  
AGCTATAAACTAGCTAGCTAGTAGAGCTTCTGCAGGCTCGACGTTAACTACGTAC  
TAGCTAGCTAGTTTTCT

をpJCA002のBamHIおよびHindIII部位  
に挿入してpCE72を形成することにより、追加のクロー  
ニング部位をpJCA002中に含有させた。

挿入プラスミド中にFPVフランキンゲンアームの長さを  
延長するために、プラスミドpJCA021を構成した。  
pRW731.15（前述した）からの4900bpのPvu  
II-HindIII断片をpブルースクリプトSS K<sup>-</sup>  
（カリフォルニア州、ラジョラのストラタジェネ）のSm  
aI部位およびHindIII部位に挿入することにより、  
プラスミドpJCA021を得た。次いでpCE72から  
のBglIIからEcoRIまでの断片をpJCA021  
のBglIIおよびEcoRI部位に連結することにより  
pCEN100を産生した。

MDV gB配列をTROVAC中に挿入するためのプラ  
スミドの構成

ポリメラーゼ連鎖反応(PCR)により産生した3つの  
断片が挿入プラスミドの構成に必要であった。反応1によ  
り、MDV gB遺伝子の5'末端を有する正確なATG:  
ATG配置中に融合したワクシニアウイルスH6プロモ  
ーターを含有した断片を生成した。この反応のために、前述  
したH6プロモーター（テイラー等、1988a、b；グオ等、  
1989）を含有するプラスミドpRW825を、テンプレ  
ートとして用い、オリゴヌクレオチドRW297（配列認識  
番号30）およびRW298（配列認識番号31）

RW297: GACCTCGTCGACAATACGACTCACTATAGGGAG  
 RW298: GAAGAATATGCAATTCGCGCTAAATAGTGCAATTACGATACAACTTAA

をプライマーとして用いた。

反応2により、TTTTTTT配列がTATTCCTTに変えられて初期終止の可能性のないMDV gB遺伝子の5'末端を含有する断片を産生した(ユニンおよびモス、1987)。産生した断片の3'末端を、反応3において産生した断片の5'末端と重複させた。反応2において、MDV gB暗号配列を含有するプラスミドpUC13gBをテンプレートとして用い、オリゴヌクレオチドRW299(配列認識番号32)およびRW300(配列認識番号33)

RW299: ATGCACTATTTAGGCGGAATTCATATTTCTTCTATAGTTATTC  
 RW300: ATATCTACGATGATTTCTAGGTTGCGGACATTTTC

をプライマーとして用いた。

反応3により、MDV gB遺伝子の3'末端を定義する断片を産生し、pUC13gBに含まれた非暗号配列を除去した。プラスミドpUCgBをこの反応のテンプレートとして用い、RW301(配列認識番号34)およびRW302(配列認識番号35)

RW301: GTCCCGAAGCTAGAAAATCATCGTAGATATTTCTG  
 RW302: CCTCAGGAATTCGTCGACTATTACACAGCATCATCTTCTGAG

をプライマーとして用いた。

VCは、パークス等(1989)により記載された宿主範囲選択システムを用いた挿入プラスミドである。このプラスミドにおいて、ワクシニアウイルスK1L遺伝子およびポリリンカー領域はフランキンゲンバーゲンワクシニアアーム内に位置しており、ゲーベル等(1990a、b)により記載されたATI領域(読取り枠A25LおよびA26L)を置換した。全領域はpUC8ベクター中にあり、挿入部位は翻訳停止コドンおよび転写停止信号の側面にある。プラスミドpRW879をNYVAC(vP866)によるin vitro組換えにおけるレスキューウイルスとして用い、マレックgB遺伝子を発現する組換え体vP935を誘導した。

MDV gDをワクシニアウイルス中に挿入するためのプラスミドの構成

4つのPCR反応を用いて挿入プラスミドを産生した。反応1において、プラスミドをpRW880をテンプレートとして用いて、MDV gD遺伝子の開始ATGを重複させるプロモーターのATGによりMDV gD5'配列に連結したワクシニアウイルスH6プロモーター配列を含有する断片を誘導した。プラスミドpRW880は、F16挿入座中の非関連遺伝子に連結した、前述のH6プロモーター配列を含有している。この反応に用いたプライマーはRW389(配列認識番号36)およびRW390(配列認識番号37)

これらの3つのPCR反応の産生物を濃縮し、第4のPCRにおいて、プライマーRW297(配列認識番号30)およびRW302(配列認識番号35)のテンプレートとして用いた。最終的な1250bpのPCR産生物を単離し、HincIIで切断し、HincIIで切断したプラスミドpCEN100中に挿入してpRW871を誘導した。F8への挿入を指示しているTROVACゲノムDNAを含有するpCEN100の誘導について上述している。プラスミドpRW871を部分的にXbaIで切断し、線状産生物を単離し、AflIIIで再切断して、7.7kbpの断片を単離した。プラスミドpUC13gBをAflIIIおよびXbaIで切断し、gB暗号領域を含有する、生成した2140bpの断片をpRW871から誘導された7.7kbpの断片中に挿入した。生成したプラスミドpRW878をTROVACによるin vitro組換え中でレスキューウイルスとして用いて、組換え体vFP108を誘導した。

MDV gBをワクシニアウイルス中に挿入するためのプラスミドの構成

前述したpRW878をHincIIで切断し、ワクシニアウイルスH6プロモーターに連結したMDV gB暗号配列を含有する2.8kbpの断片を、ワクシニア挿入プラスミドpSD553VCのSmaI部位に挿入し、プラスミドpRW879を誘導した。プラスミドpSD553

RW389: TGAGATATATCTAAAGAAGAACTTTTCATTACGATACAACTTAAC  
 RW390: TAATATAATCTTTTATAC

であった。

第2および第3のPCR反応において、pMDV517をテンプレートとして用いた。プラスミドpMDV517は、pUC13のEcoRIで挿入されたMDV gD遺伝子を含有する5.2kbのDNA断片を含有している。反応の目的は、2つの内部TTTTTNT信号を変更して未熟終止の可能性をなくすことにあった(ユニンおよびモス、1987)。第2の反応において、オリゴヌクレオチドRW386(配列認識番号38)およびRW391(配列認識番号39)

RW386: CCGTTCAGCTTCTTCGTCAATGGTACAACACGGCTGTAGAC  
 RW391: GAGCGGTCGACAAGCTTATAGGCGGGAATATGC

をプライマーとして用いて、TTTTTTTTTTをTTCTTCTTTに変更した。

第3の反応において、オリゴヌクレオチドRW387(配列認識番号40)およびRW388(配列認識番号41)

RW387: TGTGTACCATGACGAAGAAGCTGAACGGTTTGCATAGTTTGTATC  
 RW388: ATGAAAGTATCTTCTTTAGATATATCTCATCCAC

を用いて、配列TTTTTTTTTGを配列CTTCTTTCTGに変更した。

3つのPCR反応の産生物を集積し、第4のPCR反応のためにRW390（配列認識番号37）およびRW391（配列認識番号39）により活性化した。最終的なPCR反応の産生物をNruIおよびHindIIIで切断し、H6プロモーターの3'末端およびMDV gD暗号配列を含有する1.2 kbpの断片を得た。プラスミドpRW880（以下に記載する誘導）をNruIおよびHindIIIで切断し（非関連遺伝子を除去してH6プロモーターの5'末端を残す）、最終PCR産生物の切断後に得た1.2 kbp断片と連結した。次いで生成したプラスミドpRW893をNotIで切断し、以前に記載したpSD533VCのSmaI部位に挿入されたH6プロモーター（promoted）MDV gD遺伝子を含有する1.4 kbp断片を放出してpRW894を産生した。NYVAC（vp866）によるin vitro組換えにおいてレスキューウイルスとしてプラスミドpRW894を用いて、マレックgD遺伝子を発現する組換え体vP1005を産生した。

#### F16座での鶏痘挿入プラスミドの構成

プラスミドpFP23K-1は、タータグリア等（1990）に記載された10.5 kbpのHindIII鶏痘DNA断片を含有している。以下のプライマーRW264（配列認識番号42）、RW265（配列認識番号43）、RW266（配列認識番号44）およびRW267（配列認識番号45）

写停止信号は、挿入部位を側腹に有する。RW267の5'末端は、EcoRI部位で始まる位置10,229 bpにある。

第3および最終PCR産生物をNdeIとEcoRIで切断し、pRW175のNdeI部位とEcoRI部位の間に挿入し、pRW864を産生した。プラスミドpRW715はPvuIIで切断されたプラスミドpUC9である。EcoRIリンカーを300 bpのPvuII断片の位置に挿入した。E. coli LacZ遺伝子を挿入するために、プラスミドpAMIBGを用いた。プラスミドpAMIBGは、11Kワクシニアウイルスプロモーター（パオレッティ等、1984）の前述したBamHI部位3'に挿入されたpMC1871（カサダバン等、1983）からのLacZ BamHI断片を含有している。プラスミドpAMIBGをBamHIで部分的に切断し、線状産生物を単離してPstIで切断した。11Kプロモートした（promoted）LacZ遺伝子を含有するPstI-BamHI断片をプラントエンドとし、pRW864（上述）のSmaI部位中に連結した。産生したプラスミドをpRW867Aと称した。

プラスミドpRW866は、タータグリア等（1990）に記載された10.5 kbpの鶏痘DNA断片を含有しているプラスミドpFP23K-1のサブクローンである。pFP23K-1からの7.3 kbpのNaeIからNdeIまでの鶏痘断片をpUC9のPvuII部位とNdeI部位の

```

RW264:  AATTAACCGGGATCCAAGCTTCTAGCTAGCTAATTTT
        ATAGCGGCCGCTATAATCGTTAACTTATTAG

RW265:  CTAGCTAGAAGCTTGGATCCCGGGTTAATTAATTAATAAAAA
        GCGGCCGCGTTAAAGTAGAAAAATG

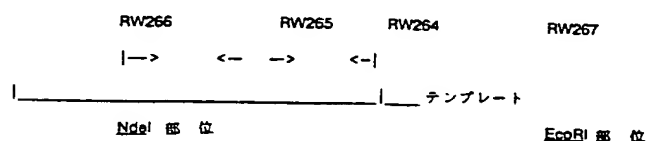
RW266:  GTTACATATGTACAGAATCTGATCATAG

RW267:  GCTAGAATTCTCTAGTTTTATAGTTG

```

を用いたPCR反応のために、テンプレートとしてプラスミドpFP23K-1を用いた。

プライマーRW264およびRW267は第1の反応を活性化した。プライマーRW265およびRW266は第2の反応を活性化した。RW266、RW267および第1および第2の反応による2つの産生物を最終PCRのために結合した。テンプレート上のプライマーの指向（orientation）は以下のとおりである：



プライマーRW266は、NdeI部位を有する10.5 kbpの配列内の位置9883から始まる。RW265およびRW264の5'末端は重複し、互いに逆の補体である。RW265およびRW264は、位置10,054 bpでのAを、挿入部位SmaI、BamHIおよびHindIIIを含有する61 bpにより置き換える。翻訳終止コドンおよび転

写に挿入することにより、プラスミドpRW866を構成した。プラスミドpRW866は2つのFspI部位を含有している；1つはpUC中にあり、位置1955 bpでのもう1つはF16と称する遺伝子間挿入部位を定義している。FspI挿入座は、ATGを含有しているいかなる読取り枠をも妨害しない。pRW866をFspIで部分的に切断して得た線状産生物を単離し、11KプロモートしたLacZ遺伝子を含有するpRW867Aからの3.3 kbpのNotI断片に連結した。この操作により、プラントエンドとしたLacZ遺伝子断片をFspI遺伝子間挿入部位中に挿入してプラスミドpRW868を産生できた。pRW868中のLacZ遺伝子を、SmaI部位、BamHI部位およびHindIII部位を含有し、pRW864の発現に用いた翻訳停止配列および転写終止配列を側腹に有する61 bp断片（前述）と置き換えた。この置換の結果として、プラスミドpRW813が得られた。プラスミドpRW894の最初の構成にテンプレートとして用いたプラスミドpRW880は、F16挿入座のSmaI部位のH6プロモーターに連結した非関連遺伝子を含有している。

#### 実施例3—MDV糖タンパク質を発現するボックスウイルススペースの組換え体の発現

前述したプラスミドを、前述したリン酸カルシウム沈殿法を用いることにより、NYVACまたはTROVAC感

染細胞中にトランスフェクションした（パニカリおよびバオレッティ、1982；ビッチーニ等、1987）。陽性ブラークを特定のMDV放射線標識化プローブに対する凝集形成に基づいて選択し、この陽性ブラークについて純粋な固体群が達成されるまで連続してブラーク精製を行なった。各々の1VRからの代表的なブラークを増幅し、保存ウイルスを確立した。

テイラー等（1990）に記載されたようにニワトリ392番と称する多クローン性ニワトリ抗-MDV血清を用いて間接免疫蛍光法を行なった。

テイラー等（1990）に記載されたように上述した試薬を用いてイムノプレシビテーション反応を行なった。

#### MDV糖タンパク質を発現するNYVAC組換え体

プラスミドpRW879のトランスフェクションにより、NYVAC組換え体vP935が発生した。免疫蛍光法分析により、MDV免疫血清により認識されたタンパク質が感染細胞表面上に発現されることが示された。ニワトリからの同一の免疫血清を用いたイムノプレシビテーションにより、110 kDa、64 kDaおよび48 kDaのおおよその分子量を有する3つの主要発現産生物の存在が検出された。これらのサイズはMDV gB遺伝子の予期した産生物に対応している。

プラスミドpRW894のトランスフェクションによりNYVAC組換え体vP1005が発生した。ブラークの

イムノスクリーン検定（immunoscreen assay）により、MDV免疫血清により認識されたタンパク質が感染細胞表面上に発現されることが示された。イムノプレシビテーション分析により、処理した糖タンパク質を示す45 kDa（タンパク質の前駆体形状に対応する）および65 kDaのおおよその分子量を有する2つの産生物の産生が示された。

#### gB糖タンパク質を発現するTROVAC組換え体

プラスミドpRW8778のトランスフェクションにより、組換え体vFP108が発生した。免疫蛍光法分析により、MDV免疫血清により認識されたタンパク質が感染細胞表面上に発現されることが示された。ニワトリからの同一の免疫血清を用いたイムノプレシビテーション分析により、110 kDa、64 kDaおよび48 kDaのおおよその分子量を有する3つの主要発現産生物の存在が検出された。

#### 実施例4—ニワトリの免疫化と続いての抗原投与

生後25日のSPFのニワトリの群に、1回の投与量が4.0 log<sub>10</sub> pfuのTROVAC-MDV gB（vFP108）を皮下経路で接種した。10羽のニワトリは接種しないままにした。接種から14日後、10羽の接種していない対照を含むニワトリに、事前に100%が死に至ることを確認したJMV腫瘍細胞系の希釈物を腹腔内接種により抗原投与し、生存したニワトリを評価した。

防御の結果を表1に示す。

表 1

SPFニワトリにおけるTROVAC-MDV gB（vFP108）の効能		
防御率		
処理群	生存/合計	生存%
vFP108*	11/25	44
ワクチン接種しない対照	0/10	0

a: ニワトリに4.0 log<sub>10</sub> pfuのvFP108を接種した。14日後に、JMV腫瘍細胞系の接種によりニワトリに抗原投与した。

第2の実験において、アイソレート中でふ化し、MDV、七面鳥のヘルペスウイルス（HVT）および他のアビアン病原に対する母性抗体を有さない20羽のロードアイランドレッドひな鳥に、生後初日に6.3 log<sub>10</sub> pfuの鶏痘組換え体vFP108を筋肉内ワクチン接種した。接種から7日後、接触感染によりひな鳥にMDVを抗原投与した。ワクチン接種したひな鳥と、15日前に3.0 log<sub>10</sub> pfuのMDVのRB1-B菌株を接種した8羽のニワトリと混合することにより接触感染を行なった。同一のふ化から由来した20羽のワクチン接種しないひな鳥の第2の群を対照として用いた。また上述したような接触によりこれらにMDVの抗原投与を行なった。2つの群を、高水準安全室中の別々のかごに保持した。20羽のワクチン接種しないひな

鳥の第3の群には、3.0 log<sub>10</sub> pfuのRB1-Bを接種することにより抗原投与し、別室に保持した。この群は、2つの方法による抗原投与の効果を比較する実験のために採用した。

ひな鳥を毎日観察し、死んだひな鳥について内臓器および末梢神経における大きなマレック病の病巣について試験した。大きなマレック病の病巣が明らかではない場合には、組織実験のために組織細胞を採取した。

鶏痘組換え体によりワクチン接種した群の2羽のひな鳥は、おそらくは鶏痘による眼感染の症候群を示し、MDV感染ひな鳥との接触から2日以内に死んだ。それらは実験から除外し、表2および第7図に示した致死結果には含まない。

結果により、鶏痘組換え体によるワクチン接種が致死を著しく遅らせたことが分かる。ワクチン接種した群とワクチン接種しなかった群（接触抗原投与）における死亡の平均時間は、それぞれ56日と35日であった。スチューデントのt検体を用いたデータのログトランスフォーメーションの分析により示されたように、差は著しかった（P<0.005）。

19週の延長期間後、2つの群における合計の致死は、カイ二乗検定により示したように著しくは異ならなかった。しかしながら、ワクチン接種後6から7週間目に、致死率は、対照ではほぼ100%であり、ワクチン接種したひな鳥で

表 2

死亡までの期間(日)

鶏痘ワクチン接種	ワクチン接種せず	ワクチン接種せず
接触抗原投与	接触抗原投与	接種抗原投与
46	36	10
44	17	26
110	32	39
77	48	26
97	64	42
53	47	28
41	31	32
35	45	24
56	33	24
52	32	33
57	13	10
51	33	34
	48	22
	50	10
	27	42
	45	9
	35	29
	40	24
	38	
数	12	18
平均	56	35
標準偏差	18	20

は10%であるように著しく異なった。ブロイラーのニワトリは通常生後6から7週間で市場に送られることに注意すべきである。

接触感染による抗原投与は接種による抗原投与と比較して効果的であったことが第7図から分かる。2つの群の合計致死は同様であり、累積致死曲線の傾斜は約2週間遅れた後(接触感染)同様になった。これはおそらく、感染を確立するのに必要な時間を示すものであろう。

ワクチン接種した群は、同一の室に保持されたワクチン接種しなかった群により放たれたMDVに暴露され続けたことに注意すべきである。

結論として、初生日にワクチン接種され、2つの異なる方法によるMDVを抗原投与した、遺伝的に感受性のあるニワトリを使用する厳しい条件下で、防御免疫原としてのMDV gBの重要性示された。

結果は、家きん工業におけるMDVに対するワクチン接種のためのTROVAC-MDV組換え体の潜在能力を示している。鶏痘ウイルスの制限宿主範囲により、組換え体の非アビアン種へのトランスミッションに対する固有の安全バリアが得られる。全体のウイルスというよりもむしろMDVの抗原領域を使用すれば、生ヘルペスウイルスを環境に導入する必要性がなくなる。大量の異種遺伝情報を含むTROVACの能力により、血清型の範囲から多くの抗原決定基を含むことを考慮すべきである。

#### 実施例5-TROVAC-MDVの比較効能(vFP108およびHVT)

以前の実験において、TROVAC-MDV(vFP108)のMDV抗原投与に対して防御する能力を2つの方法により評価した。第1の実験において、初生のSPFのニワトリに40log<sub>10</sub>pfuのvFP108を皮下経路で首すじにワクチン接種した。接種から14日後にニワトリに腹腔内でJMV腫瘍細胞系を接種することにより抗原投与し、44%のニワトリが抗原投与に対して生存した。第2の実験において、初生のSPFのニワトリに、6.3log<sub>10</sub>pfuのvFP108を筋肉内経路によりワクチン接種した。接種から7日後、ワクチン接種したニワトリとワクチン接種しなかったニワトリに、MDV菌株RB18に感染したニワトリによる接触感染によって抗原投与した。ワクチン接種から6から7週間後に、90%のワクチン接種した

ニワトリが抗原投与に対して生存した。

最も一般的に用いられるMDVワクチンは、血清学的にMDVに関連する七面鳥ヘルペスウイルス(HVT)ワクチンである。この実施例はHVTおよびTROVAC-MDV(vFP108)の比較効能を示している。

生後20日のSPFニワトリに、皮下経路により3.8log<sub>10</sub>ELD<sub>50</sub>のTROVAC-MDV(vFP108)を首すじに接種した。20羽のニワトリに皮下経路で3.0log<sub>10</sub>pfuの細胞関連HVTワクチンを接種した。10羽のニワトリは接種しないままにした。接種から5日後、ワクチン接種したニワトリと対照のニワトリに、RB18抗原投与ウイルスを腹腔内接種により抗原投与した。検死した49日までの期間に亘りニワトリを観察し、マレック病に典型的な病巣について試験した。抗原投与の結果を表3に示す。

結果は、ワクチン接種をせずに抗原投与した対照の90%が感染のために死亡したことが分かる。TROVAC-MDV(vFP108)をワクチン接種したニワトリは、75%の生存率を示し、HVTワクチンを接種したニワトリは85%の生存率を示した。この結果は、TROVAC-MDV(vFP108)ワクチンにより与えられた防御は細胞関連HVTに匹敵したことを示している。したがって、TROVAC-MDVは効果的なワクチンである。



## TROVAC-MDV (vFP108) および H V T の比較効能

ワクチン	防御率	防御%
TROVAC-MDV (vFP108)	15/20	75
H V T	17/20	85
無	1/10	10

a : 抗原投与した合計数に対して防御されたひな鳥の率

1. Bertholet, C., R. Drillien, and R. Wittek, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82, 2096-2100 (1985).
2. Bournsnel, M.E.G., P.F. Green, A.C.R. Samson, J.I.A. Campbell, A. Deuter, R.W. Peters, N.S. Millar, P.T. Emerson, and M.M. Binns, *Virology* 178, 297-300 (1990a).
3. Bournsnel, M.E.G., P.F. Green, J.I.A. Campbell, A. Deuter, R.W. Peters, F.M. Tomley, A.C.R. Samson, P. Chambers, P.T. Emerson, and M.M. Binns, *J. Gen. Virol.* 71, 621-628 (1990b).
4. Calnek, B.W. and R.L. Witter, *In Diseases of Poultry* 9th Edition, eds. B.W. Calnek, H.J. Barnes, C.W. Beard, W.M. Reid and H.W. Yoder, Jr. (Iowa State University Press, Ames, Iowa, USA) pp. 342-385 (1991).
5. Calnek, B.W., K.A. Schat, L.J.N. Ross, W.R. Shak, and C.-L.H. Chen, *Int. J. Cancer* 33, 389-398 (1984).
6. Calnek, B.W., K.A. Schat, E.D. Heller, and C. Buscaglia, *In Proc Int Symp Marek's Dis*, ed. B.W. Calnek and J.L. Spencer (Am. Assoc. Avian Pathol, Kennett Square, PA) pp. 173-187 (1985).
7. Cantin, E.M., R. Eberle, J.L. Baldick, B. Moss, D.E. Willey, A.L. Notkins and H. Openshaw, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 84, 5908-5912 (1987).
8. Casadaban, M.J., A. Martinez-Arias, S.K. Shapira, and J. Chow, *Methods in Enzymology* 100, 293-308 (1983).
9. Clewell, D.B., and D.R. Helinski, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 62, 1159-1166 (1969).
10. Clewell, D.B., *J. Bacteriol.* 110, 667-676 (1972).
11. Colinas, R.J., R.C. Condit, and E. Paoletti, *Virus Research* 18, 49-70 (1990).
12. Cremer, K.J., M. Mackett, C. Wohlenberg, A.L. Notkins and B. Moss, *Science* 228, 737-740 (1985).
13. Edbauer, C., R. Weinberg, J. Taylor, A. Rey-Senelonge, J.F. Bouquet, P. Desmetre, and E. Paoletti, *Virology* 179, 901-904 (1990).
14. Engelke, D.R., P.A. Hoener, and F.S. Collins, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85, 544-548 (1988).
15. Esposito, J.J., *Fifth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*, Archives of Virology Supplement 2, eds. R.I.B. Francki, C.M. Faquet, D.L. Knudson, F. Brown, (Springer-Verlag, New York) pp 91-102 (1991).
16. Goebel, S.J., G.P. Johnson, M.E. Perkus, S.W. Davis, J.P. Winslow, and E. Paoletti, *Virology* 179, 247-266 (1990a).
17. Goebel, S.J., G.P. Johnson, M.E. Perkus, S.W. Davis, J.P. Winslow, and E. Paoletti, *Virology* 179, 517-563 (1990b).
18. Guo, P., S. Goebel, M.E. Perkus, J. Taylor, E. Norton, G. Allen, B. Languet, P. Desmetre, and E. Paoletti, *J. Virol.* 64, 2399-2406 (1990).
19. Guo, P., S. Goebel, S. Davis, M.E. Perkus, B. Languet, P. Desmetre, G. Allen, and E. Paoletti, *J. Virol.* 63, 4189-4198 (1989).
20. Kato, S. and K. Hirai, *Adv. Virus Res.* 30, 225-277 (1985).
21. Mandeki, W., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83, 7177-7181 (1986).
22. Maniatis, T., E.F. Fritsch, and J. Sambrook, *Molecular Cloning*, Cold Spring Harbor Laboratory, NY 545 pages (1982).
23. Maniatis, T., E.F. Fritsch, and J. Sambrook, *Molecular Cloning*, Cold Spring Harbor Laboratory, NY 545 pages (1986).
24. Marchioli, C.C., R.J. Yancey, E.A. Petrovskis, J.G. Timmins and L.E. Post, *J. Virol.* 61, 3977-3981 (1987).
25. Nazerian, K., E.A. Stephens, J.M. Sharma, L.F. Lee, M. Gaillitis and R.L. Witter, *Avian Diseases* 21, 69-76 (1977).
26. Okazaki, W., H.G. Purchase, B.R. Burmester, *Avian Dis* 14, 413-429 (1970).
27. Ono, K., M. Takashima, T. Ishikawa, M. Hayashi, I. Yoshida, T. Konobe, K. Ikuta, K. Nakajima, S. Ueda, S. Kato and K. Hirai, *Avian Dis* 29, 533-539 (1985).
28. Panicali, D., and E. Paoletti, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 79, 4927-4931 (1982).
29. Paoletti, E., B.L. Lipinskas, C. Samsonoff, S. Mercer and D. Panicali, *Proc. Nat. Acad. Sci.* 81, 193-197 (1984).
30. Payne, L.N., J.A. Frazier, P.C. Powell, *Int. Rev. Exp. Pathol.* 16, 59-153 (1976).
31. Payne, L.N. *In Marek's Disease*, ed. L.N. Payne (Martinus Nijhoff, Boston) pp. 43-76 (1985).
32. Perkus, M.E., S.J. Goebel, S.W. Davis, G.P. Johnson, K. Limbach, E.K. Norton, and E. Paoletti, *Virology* 179, 276-286 (1990).
33. Perkus, M.E., K. Limbach, and E. Paoletti, *J. Virol.* 63, 3829-3836 (1989).
34. Perkus, M.E., A. Piccini, B.R. Lipinskas, and E. Paoletti, *Science* 229, 981-984 (1985).
35. Piccini, A., M.E. Perkus, and E. Paoletti, *In Methods in Enzymology*, Vol. 153, eds. Wu, R., and Grossman, L., (Academic Press) pp. 545-563 (1987).
36. Ross, L.J.N., M. Sanderson, S.D. Scott, M.M. Binns, T. Doel and B. Milne, *J. Gen. Virol.* 70, 1789-1804 (1989).
37. Ross, L.J.N. and M.M. Binns, *J. Gen. Virol.* 72, 939-947 (1991).
38. Ross, L.J.N., M.M. Binns and J. Pastorek, *J. Gen. Virol.* 72, 949-954 (1991).
39. Sanger, F., S. Nicklen, and A.R. Coulson, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74, 5463-5467 (1977).
40. Schat, K.A., *Cancer Surveys* 6, 1-37 (1987).
41. Shapira, S.K., J. Chou, F.V. Richaud, and M.J. Casadaban, *Gene* 25, 71-82 (1983).
42. Tabor, S., and C.C. Richardson, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84, 4767-4771 (1987).
43. Tartaglia, J., S. Pincus and E. Paoletti, *Crit. Revs. in Immunol.* 10, 13-30 (1990).
44. Taylor, J., R. Weinberg, Y. Kawaoka, R.G. Webster, and E. Paoletti, *Vaccine* 6, 504-508 (1988a).
45. Taylor, J., R. Weinberg, B. Languet, P. Desmetre, and E. Paoletti, *Vaccine* 6, 497-503 (1988b).

FIGURE 1

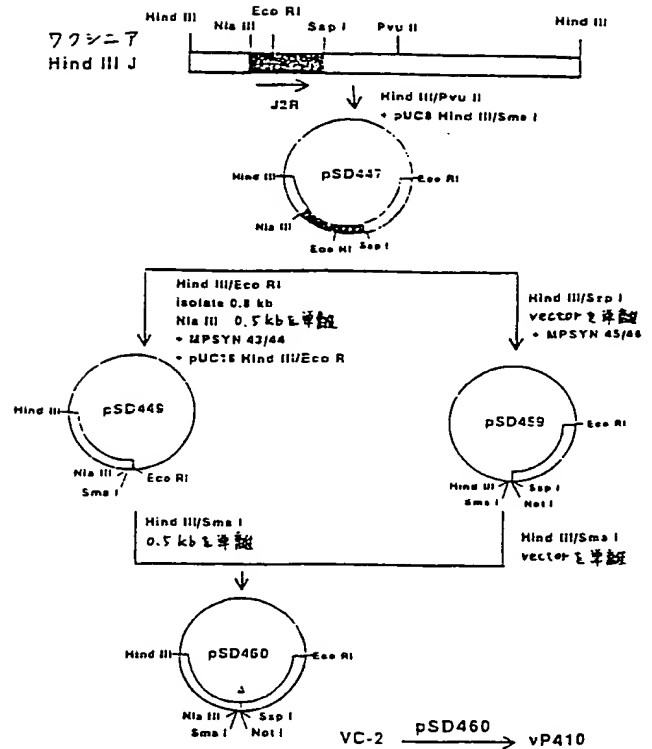


FIGURE 2

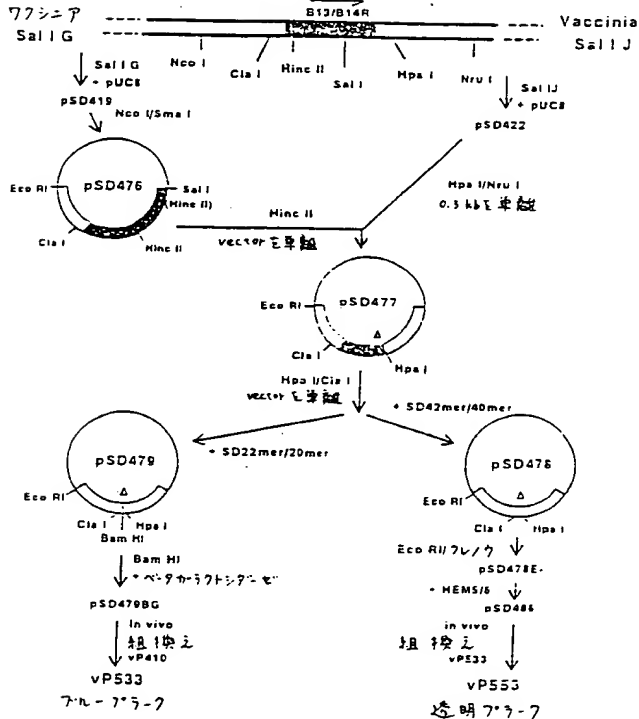
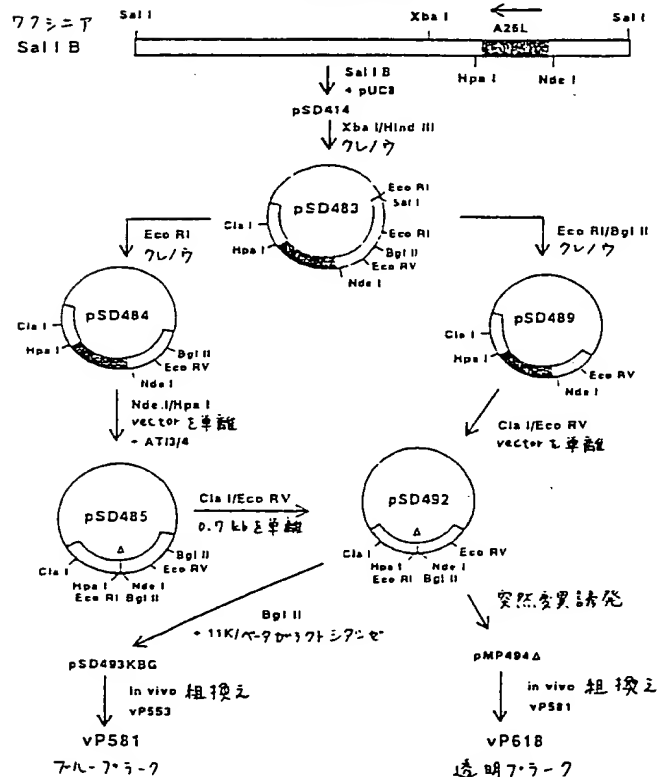


FIGURE 3





国際調査報告		International Application No. PCT/US93/00064
<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b> IPC3: C12P 31/02, 1974; C12N 1/00, 1/00, 5/00 A61K 39/12, C07K 3/00 US CL: 435/98.3, 91, 172.3, 233.1, 240.2, 424/99, 330/30 According to International Patent Classification (IPC) or to both national classifications and IPC		
<b>B. FIELDS SEARCHED</b> Maximum classification assigned (classification system known to examination system) U.S.: 435/98.3, 91, 172.3, 233.1, 240.2, 424/99, 330/30 Documentation searched other than maximum classification in the report has been determined and indicated in the fields searched Examinations have been conducted during the international search phase of this form and, where practicable, include search units: CAS ONLINE, BIOSIS, APS, Inspec, Comptel, Perovius, Marzke database, Vindex, Vindex, Physprochem, gB, Physprochem, gD		
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>		
Category*	Content of document, with abstract, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	US. A. 4,603,112 (Pasternak et al.) 29 July 1986, col. 1-3.	1-15
Y	Methods in Enzymology, Volume 153, issued 1987, Piccini, A. et al. "Vaccinia Virus as an Expression Vector", pages 545-563, see entire document.	1-15
Y	Vaccine, Volume 6, issued December, 1988, Taylor, J. et al., "Protective Immunity Against Avian Influenza Induced by a Fowlpox Virus Recombinant", pages 504-508, see entire document.	1-15
<input checked="" type="checkbox"/> Further classifications are listed in the continuation of Box C <input type="checkbox"/> See patent family notes.		
* "A" documents defining the present state of the art which is not considered to be part of the prior art. "B" documents defining the present state of the art which is not considered to be part of the prior art. "C" documents which have been classified as prior art but which are not considered to be part of the prior art. "D" documents which have been classified as prior art but which are not considered to be part of the prior art. "E" documents which have been classified as prior art but which are not considered to be part of the prior art. "F" documents which have been classified as prior art but which are not considered to be part of the prior art. "G" documents which have been classified as prior art but which are not considered to be part of the prior art. "H" documents which have been classified as prior art but which are not considered to be part of the prior art. "I" documents which have been classified as prior art but which are not considered to be part of the prior art. "J" documents which have been classified as prior art but which are not considered to be part of the prior art. "K" documents which have been classified as prior art but which are not considered to be part of the prior art. "L" documents which have been classified as prior art but which are not considered to be part of the prior art. "M" documents which have been classified as prior art but which are not considered to be part of the prior art. "N" documents which have been classified as prior art but which are not considered to be part of the prior art. "O" documents which have been classified as prior art but which are not considered to be part of the prior art. "P" documents which have been classified as prior art but which are not considered to be part of the prior art. "Q" documents which have been classified as prior art but which are not considered to be part of the prior art. "R" documents which have been classified as prior art but which are not considered to be part of the prior art. "S" documents which have been classified as prior art but which are not considered to be part of the prior art. "T" documents which have been classified as prior art but which are not considered to be part of the prior art. "U" documents which have been classified as prior art but which are not considered to be part of the prior art. "V" documents which have been classified as prior art but which are not considered to be part of the prior art. "W" documents which have been classified as prior art but which are not considered to be part of the prior art. "X" documents which have been classified as prior art but which are not considered to be part of the prior art. "Y" documents which have been classified as prior art but which are not considered to be part of the prior art. "Z" documents which have been classified as prior art but which are not considered to be part of the prior art.		
Date of the actual completion of the international search		Date of issuing of the international search report
25 March 1993		06 APR 1993
Name and mailing address of the ISA/US Comptroller of Patents and Trademarks, Box PCT Washington, D.C. 20231		Authorized officer JOAN ELLIS <i>Joan Ellis</i>
Facsimile No. NOT APPLICABLE		Telephone No. (703) 308-0196

Form PCT/ISA/210 (annex sheet) July 1992a

国際調査報告			International Application No. PCT/US93/00064
<b>C (Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>			
Category*	Content of document, with abstract, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.	
Y	Vaccine, Volume 6, issued December 1988, Taylor, J. et al., "Recombinant Fowlpox Virus Inducing Protective Immunity in Non-Avian Species", pages 497-503, see entire document.	1-15	
Y	Journal of Virology, Volume 64, No. 4, issued April, 1990, Taylor, J. et al., "Newcastle Disease Virus Fusion Protein Expressed in a Fowlpox Virus Recombinant Confers Protection in Chickens", pages 1441-1450, see entire document.	1-15	
Y	Journal of Virology, Volume 65, No. 8, issued August, 1991, Taylor, J. et al., "Vaccinia Virus Recombinants Expressing Either the Measles Virus Fusion or Hemagglutinin Glycoprotein Protect Dogs Against Canine Distemper Virus Challenge", pages 4263-4274, see entire document.	1-15	
Y	Journal of General Virology, Volume 70, issued September 1989, Ross, L.J.N. et al., "Nucleotide Sequence and Characterization of the Marek's Disease Virus Homologue of Glycoprotein B of Herpes Simplex Virus", pages 1789-1804, see entire document.	1-15	
Y	Journal of General Virology, Volume 72, issued January 1991, Ross, L.J.N. et al., "Properties and Evolutionary Relationships of the Marek's Disease Virus Homologues of Protein Kinase, Glycoprotein D and Glycoprotein I of Herpes Simplex Virus", pages 939-947, see entire document.	1-15	
Y	Journal of General Virology, Volume 72, issued January 1991, Ross, L.J.N. et al., "DNA Sequence and Organization of Genes in a 5.5 kbp EcoRI Fragment Mapping in the Short Unique Segment of Marek's Disease Virus (Strain RB1B)", pages 949-954, see entire document.	1-15	

Form PCT/ISA/210 (annex sheet) issued sheet July 1992a

フロントページの続き

(51) Int. Cl. <sup>6</sup> 識別記号 庁内整理番号  
 C 07 K 14/055 8318 -4H  
 C 12 N 7/00 9281 -4B  
 //(C 12 N 15/09 ZNA  
 C 12 R 1:92)

(81) 指定国 EP(AT, BE, CH, DE,  
 DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LU, M  
 C, NL, PT, SE), AU, CA, JP

F I

C 12 R 1:92)

(72) 発明者 タータグリア, ジェームズ  
 アメリカ合衆国 ニューヨーク州 12303  
 シェネクタディ クリスティーナ ドラ  
 イヴ 7  
 (72) 発明者 ロス, ルイス  
 イギリス国 ハンティントン アルコンベ  
 リー ビーイー17 5ディーエヌ ラスト  
 レーン スピニー ハウス (番地な  
 し)